

538,912

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年7月15日 (15.07.2004)

PCT

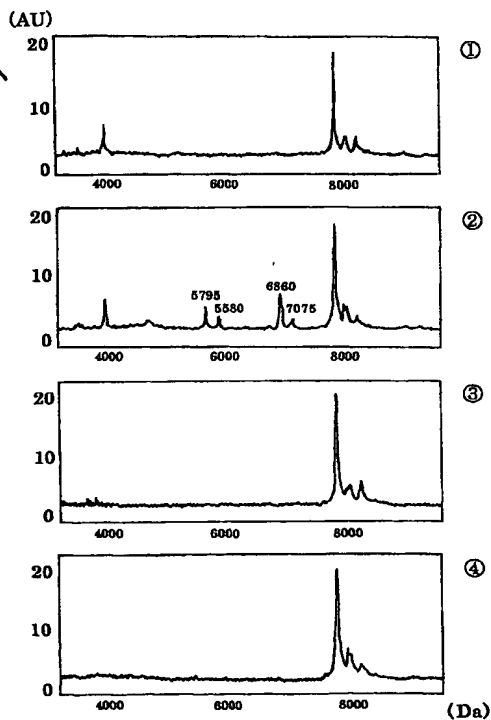
(10) 国際公開番号
WO 2004/059320 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/543 960-8161 福島県 福島市 郷野目字東一番地 Fukushima (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016601 (72) 発明者; および
- (22) 国際出願日: 2003年12月24日 (24.12.2003) (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大橋 建也 (OHASHI, Tatsuya) [JP/JP]; 〒963-8061 福島県 郡山市 富久山町福原字塩島1番地 日東紡バイオケミカル研究所内 Fukushima (JP). 三浦 俊英 (MIURA, Toshihide) [JP/JP]; 〒963-8061 福島県 郡山市 富久山町福原字塩島1番地 日東紡バイオケミカル研究所内 Fukushima (JP). 五十嵐 吉彦 (IGARASHI, Yoshihiko) [JP/JP]; 〒321-0207 栃木県 下都賀郡 壬生町大字北小林880 獨協医科大学 生化学教室内 Tochigi (JP). 野村 文夫 (NOMURA, Fumio) [JP/JP]; 〒260-0856 千葉県 千葉市 中央区亥鼻1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi) [JP/JP]; 〒260-0856 千葉県 千葉市 中央区亥鼻1-8-1 千葉大学大学院医学研究院内 Chiba (JP). 片山 勝博
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-377636 2002年12月26日 (26.12.2002) JP
特願2003-123970 2003年4月28日 (28.04.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日東紡績株式会社 (NITTO BOSEKI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒

[続葉有]

(54) Title: IMMUNOASSAY METHOD AND KIT TO BE USED THEREIN

(54) 発明の名称: 免疫測定法およびそれに用いるキット

PROTEIN CHIP ASSAY DATA
プロテインチップ測定結果

(57) Abstract: Using two types of antibodies, i.e., a first antibody having a higher affinity for a target substance than for a competitive substance and a second antibody having a higher affinity for the competitive substance than for the target substance, a specimen is treated with these two antibodies. Then the competitive substance in the specimen first binds to the second antibody and thus the ratio of the target substance to the competitive substance in the specimen is enlarged. As a result, the target substance becomes liable to bind to the first antibody and, in its turn, the reactivity of the target substance is elevated compared with the case of using the first antibody alone. Thus, the target substance in the specimen can be accurately assayed while avoiding the effects of the competitive substance contained in the specimen.

(57) 要約: 競合物質より目的物質に親和性がある第一抗体と、目的物質より競合物質に親和性がある第二抗体の2種類の抗体を用い、これらの2種類の抗体に検体を作用させることにより、まず検体中の競合物質が第二抗体に先に結合し、そのため検体中で競合物質に対する目的物質の比が大きくなることにより、目的物質が第一抗体に結合しやすくなり、その結果、目的物質の反応性が第一抗体を単独で用いるより大きくなるため、検体中に含まれる競合物質の影響を除去して正確に検体中の目的物質を測定できる。

WO 2004/059320 A1



(KATAYAMA, Katsuhiko) [JP/JP]; 〒963-8061 福島県郡山市 富久山町福原字塩島1番地 日東紡メディカル開発センター内 Fukushima (JP).

(74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

免疫測定法およびそれに用いるキット

5 技術分野

本発明は、検体中の目的物質を2種類の特徴ある抗体を用いて正確に測定することができる免疫測定法およびそれに用いるキットに関する。更に詳細には、競合物質より目的物質に親和性がある第一抗体と、目的物質より競合物質に親和性がある第二抗体の2種類の抗体を用い、これらの2種類の抗体に検体を作用させることにより、まず検体中の競合物質が第二抗体に先に結合し、そのため検体中で競合物質に対する目的物質の比が大きくなることにより、目的物質が第一抗体に結合しやすくなり、その結果、目的物質の反応性が第一抗体を単独で用いるより大きくなるため、正確に目的物質を測定できる免疫測定法およびそれに用いるキットに関する。

15

背景技術

測定目的物を含む検体中には様々な様態の物質が存在するが、あるものでは測定目的物質とそれと競合する物質が同時に存在することがある。例えば血清中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRACP : Tartrate Resistant acid Phosphatase) はその大部分が破骨細胞由来の酸性ホスファターゼとされ、その測定は破骨細胞の機能を評価する指標として有用とされており、骨吸収マーカーとして興味を持たれている物質である (骨代謝マーカー, 福永仁夫, 中村利孝, 松本俊夫編, メディカルレビュー社, 1995) が、血清中においては酵素活性を持つ酵素の他に酵素分解産物であるフラグメントが同時に存在することがわかつて (J Bone Miner Res. 15:1337-1345, 2000 ; および Clin Chem. 47:74-80. 2001) 。

25

ところで、血清中酸性ホスファターゼは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、原点より 0~5 の 6 つのバンドに分けられ、その中で 5 番目が酒石酸抵抗性であり、Band 5 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRACP 5:Tartrate

Resistant Acid Phosphatase 5) と呼ばれている。これはさらに電気泳動により糖鎖へのシアル酸結合の多い 5a と、ほとんどシアル酸結合のない 5b に分けられる。そして、5a は血小板やその他からの酵素であって血中値が変動しないのに対して、5b のみが骨吸収に伴い変動するため、5b が破骨細胞由来酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの本体であると考えられている。また Clinical Chemistry 誌 (Clin. Chem. 47:1497. 2001) でも破骨細胞由来の ACP を、TRACP 5b と略記することを勧めている。よって本明細書においても破骨細胞由来で骨吸収の指標となる ACP を意味するものは TRACP 5b として、また破骨細胞由来酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼと酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ 5b (TRACP 5b) は同義としてすべて TRACP 5b と表記する。

検体中には ACP として、TRACP 5b 以外に赤血球由来や血小板由来酸性ホスファターゼが存在する。すなわち、検体の採取により溶血が生じたとき、赤血球由来酸性ホスファターゼは検体中に含まれてくるし、検体として血清を用いる場合、血清製造時の血液凝固過程で血小板が破壊されて血小板由来酸性ホスファターゼが検体中に含まれてくる。そのため、従来の TRACP 活性測定法は、破骨細胞特異的 TRACP 5b 活性を測定しているとは言えない。この測定法の改善法としては、血清を 5 倍に希釈した液を 37℃で 1 時間インキュベートする前処理をした後、残りの TRACP 活性を、酒石酸存在下、基質として p-ニトロフェニルリン酸 (pNPP) を用いて測定する方法が知られている (日大医誌. 49:904-911. 1990 ; および Clin. Chem. 33:458-462. 1987) 。この方法は赤血球由来酸性ホスファターゼの影響は回避できるが、血小板由来酸性ホスファターゼの影響は除くことは出来ない。さらにより特異的な活性測定法として、TRACP 5b と赤血球や血小板由来酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ活性がフッ素に対する感受性に差のあることを利用した TRACP 5b 測定法がある (特開平 10-37198 号公報) 。しかしながら、赤血球及び血小板由来酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの影響はないものの、TRACP 5a の影響を除くことができず、また TRACP 5b 活性を総酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ活性からフッ素存在下で阻害されなかった活性を差し引きすることにより求めており、精度の点でさらなる改良が求められている。

免疫的測定法では、Marius E や Sari L らのポリクローナル抗体を用いる測

- 定方法 (J Clin Endocrinol Metab. 71:442-451. 1990 ; および Clin Chem. 46:1751-1754. 2000) および Jussi M. Halleen や Heather Bull らのモノクローナル抗体を用いる方法 (J Bone Miner Res. 13:683-687. 1998 ; Immunol Lett. 70:143-149. 1999 ; J Bone Miner Res. 14:464-469. 1999 ; Clin Chem. 45:2150-2157. 1999 ; および Clin Chem. 46:1751-1754. 2000) では、Band 5 全体を測定してしまうため、TRACP 5a の影響を無視できない。また、TRACP 5b を特異的に測定しているとしている Halleen らの方法は、より破骨細胞由来 TRACP 5b 活性に特異的であるが、健常者検体と骨吸収が亢進している患者検体での差が小さく、骨吸収マーカーとして感度は十分とは言えない。これらはこれまで作製されたポ
- 10 リクローナル抗体、モノクローナル抗体の TRACP 5b に対する特異性が低いことがひとつの原因であったと思われる。また、TRACP は血清中に酵素活性を持たないフラグメントを活性酵素の 10 倍量も大量に含むとの報告があることから、このフラグメントが血清中で活性型酵素と競合しているため、これまでは反応系に問題があるため特異性が低かったとも考えられるのである。
- 15 このような場合でも、これまでは酵素活性を持つ完全な物質：活性型酵素 (Intact Enzyme) と酵素分解産物 (Enzyme Degradation Products) に共通な抗原を利用して免疫測定法などによって定量を行ってきた。しかしこの結果モノクローナル抗体のようにエピトープが限定された場合、測定できる分解フラグメントとできないフラグメントが現れたりするため、同一の目的物を測っても各キッ
- 20 トによって相関性がなくなるなどの問題があると考えられる。また、先に例を挙げた TRACP はフラグメント量が臨床的に骨吸収を反映しないという報告もあり (J. Bone Miner. Res., 15:1337-1345, 2000 ; および Clin. Chem. 47:74-80, 2001) 、酵素活性体だけを測定することが求められる良い例と考えられる。この
- 25 ような場合フラグメントを取り除き、酵素量だけを測定する必要があるが、一般的に活性測定法による TRACP の測定は、この活性のないフラグメントが酵素と競合するため測定が正確に行われなかったと考えられる。また、これまでは明確な蛋白質フラグメント分離を行うためのフラグメント特異的抗体が存在せず、手段自体が存在しなかった。

発明の開示

本明細書で説明する TRACP はその精密測定が臨床的に有意な意義を持つと言われながら長く不可能であった。その理由には 2 つが考えられる。1点目は破骨細胞の活性を表す TRACP 5b に対する特異性の高い抗体がなかったことである。

- 5 2点目は血清中に TRACP 酵素分解蛋白質フラグメントが活性酵素以上に大量に存在することである。

よって本発明では TRACP 活性酵素に結合定数値の高い第一抗体と、酵素とはほとんど反応せず不活性分解酵素と結合する第二抗体を開発し、同一反応系中で利用することによって、分解物の影響を回避して酵素活性量のみを正確に測定し

- 10 ようとするものである。

本発明はかかる問題に鑑み、まず測定対象目的物質と反応性の高い第一抗体と、不活性フラグメントなど競合する物質と強く反応する第二抗体を組み合わせ使用することで反応系中の競合物質の影響を除き、活性酵素等の目的物質を特異的に精密測定する免疫測定法を提供する。

- 15 しかし、本発明は、検体中の目的物質を 2 種類の抗体を用いて測定する免疫測定法であって、

(i) 第一抗体が目的物質と競合物質に親和性があり、(ii) 第一抗体が競合物質より目的物質に親和性があり、(iii) 第二抗体が目的物質より競合物質に親和性があり、かつ (iv) 第二抗体の競合物質への親和性が第一抗体の目的物質

- 20 への親和性より大きい、第一抗体および第二抗体の 2 種類の抗体を用い、

担体に吸着している第一抗体と、第二抗体とに、検体中の目的物質および競合物質を結合させ、

次いで、結合した目的物質のレベルを測定することにより、該検体中の目的物質を測定する免疫測定法である。

- 25 更に本発明は、検体中の目的物質を 2 種類の抗体を用いて免疫測定するためのキットであって、

(i) 第一抗体が目的物質と競合物質に親和性があり、(ii) 第一抗体が競合物質より目的物質に親和性があり、(iii) 第二抗体が目的物質より競合物質に親和性があり、かつ (iv) 第二抗体の競合物質への親和性が第一抗体の目的物質

への親和性より大きい、第一抗体および第二抗体の2種類の抗体を含むキットである。

図面の簡単な説明

- 5 図1はサイファージェン社のプロテインチップシステムを用いた解析結果の簡易図面を示す。(1)、(2)から Trk49 が小児血清中に特異的に反応するフラグメントを4種類持っている事がわかった。一方 Trk62 では(3)、(4)から特異的に反応するフラグメントは全くなかった。

- 図2では骨粗鬆症患者におけるホルモン治療療法前後の血清を測定している。
- 10 治療前に認められる2つのピークは治療後には消失している。このことからこれらのフラグメントが骨吸収特異的である事が考えられる。

図3は、同一濃度の抗体 Trk49 と Trk62 を利用した ELISA の結果を示す。Trk49 は弱い反応性しか示さなかった。しかし Trk49 と Trk62 を同時に利用したプレートでは Trk62 を単独で使用した場合よりも反応性が向上している。

- 15 図4は、抗体 Trk62 をプレートに吸着させ、抗体 Trk62、Trk49 のいずれかをラテックス粒子に吸着させて ELISA を行った結果を示す。プレートと競合する Trk62 抗体感作ラテックス試薬では添加ラテックス試薬濃度が高くなるにつれて発色が弱くなっている。しかし Trk49 感作ラテックス試薬では 0.1% ~ 0.15% 実験区では逆に酵素の発色値が強くなった。よって Trk49 抗体感作ラテックス試薬はプレートに吸着された Trk62 と併用することで効果をあげられる
- 20 ことがわかった。

発明を実施するための形態

- 本発明の免疫測定法では、検体中の測定対象物である目的物質を測定するため
- 25 に第一抗体と第二抗体の2種類の抗体を用いる。第一抗体と第二抗体とは、

(i) 第一抗体が目的物質と競合物質に親和性があり、(ii) 第一抗体が競合物質より目的物質に親和性があり、(iii) 第二抗体が目的物質より競合物質に親和性があり、かつ (iv) 第二抗体の競合物質への親和性が第一抗体の目的物質への親和性より大きいものである。ここで競合物質とは、測定対象物である目的物

質と類似の抗原性を有し、目的物質に対する抗体を作成した場合に目的物質と競合してその抗体と結合する性質を有する物質を指す。例えば、目的物質が蛋白質や酵素である場合には、その競合物質としては、それら蛋白質や酵素の断片フラグメント、それらを構成するアミノ酸配列においてアミノ酸残基が置換、欠失もしくはは付加した変異体、それらにリン酸エステル基が付加したり糖鎖部分が変化した修飾体などが挙げられる。

本発明では、測定対象である目的物質の代表的なものとして活性型酵素が挙げられ、目的物質が活性型酵素の場合の競合物質としては、該酵素活性のない物質、例えば酵素が分解された産物、即ち、酵素分解産物が代表的なものとして挙げられる。

本発明における第一抗体および第二抗体は、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであってもよい。

本発明で用いる第一抗体および第二抗体は、例えば、測定対象である目的物質を抗原として動物に免疫し、その脾臓細胞とミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを作成し、それらのハイブリドーマが産生する各種のモノクローナル抗体から、第一抗体と第二抗体の2種類の抗体として、(i) 第一抗体が目的物質と競合物質に親和性があり、(ii) 第一抗体が競合物質より目的物質に親和性があり、(iii) 第二抗体が目的物質より競合物質に親和性があり、かつ (iv) 第二抗体の競合物質への親和性が第一抗体の目的物質への親和性より大きい、2種類のモノクローナル抗体を選択することにより、作成することができる。本発明においては、第二抗体は目的物質と競合物質とのいずれにも親和性のある抗体であっても構わない。目的物質と競合物質に対して上記した4つの条件を満たす2種類のモノクローナル抗体を得るためには、例えば、各種モノクローナル抗体の目的物質および競合物質に対する結合性を、ELISA 法などによって測定し、その測定結果から上記4つの条件を満たす2種類のモノクローナル抗体を選択すればよい。あるいは、目的物質と競合物質に対するモノクローナル抗体の結合定数を公知の方法（蛋白質・酵素基礎実験法、南江堂）に従って測定し、その結果から2種類のモノクローナル抗体を選択することもでき、また、モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトカラムを作成し、それらに吸着する目的物質

と競合物質を検定することによっても2種類のモノクローナル抗体を選択することができる。

第一抗体と第二抗体の2種類の抗体が、抗血清あるいはポリクローナル抗体の場合には、例えば、測定対象である目的物質で、アジュバントを変えたり免疫条件を変えたりして各種条件下に動物を免疫し、得られる抗血清あるいはポリクローナル抗体について、上記したモノクローナル抗体と同様の方法で目的物質や競合物質との結合性を測定し、上記4つの条件を満たす2種類の抗体を選択すればよい。

本発明で用いる2種類の抗体の代表例として、破骨細胞由来 TRACP 5b 測定に用いることができる2種類のモノクローナル抗体を挙げることができる。本発明により得られた TRACP 5b についての2種類のモノクローナル抗体は、これまで報告されてきたモノクローナル抗体よりも更に TRACP 5b と反応性が高くフラグメントとほとんど反応しない第一のモノクローナル抗体と、不活性酵素フラグメントと反応し活性酵素とほとんど反応しない第二のモノクローナル抗体である。

これら2種類の抗体を利用して、TRACP 5b 不活性フラグメントとその他の血中アイソザイム（赤血球、血小板、好中球、マクロファージ）の影響を殆ど受けない破骨細胞由来 TRACP 5b 特異的免疫測定法が可能となった。

以下に、これらのモノクローナル抗体を例として、本発明で用いる2種類の抗体について更に詳細に説明する。

上記モノクローナル抗体はヒト破骨細胞由来精製 TRACP 5b を免疫原として使用することにより得ることができる。以下に説明する方法では正常破骨細胞による抗原により免疫を行ったが、これに限らず破骨細胞腫瘍などの TRACP 5b も抗原として用いることができる。

上記モノクローナル抗体は精製ヒト TRACP 5b を免疫原として動物を免疫し、その抗ヒト TRACP 5b 抗体産生細胞と骨髓腫瘍細胞とを融合させることによってえられるハイブリドーマによって産生される。

上記ハイブリドーマは以下の方法によって得ることができる。即ち上述のようにして得たヒト TRACP 5b をフロイントの完全、不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント、百日咳アジュバント等既に公知のものを用いてともに

混和し、感作用アジュバント液を作製して数回に分けてマウス、ラット等の動物に 1~3 週間おきに腹腔内皮下、または尾静脈投与することによって免疫する。感作抗原量は $1\mu\text{g}$ ~100mg の間とされているが、一般的には $50\mu\text{g}$ 程度が好ましい。免疫回数は 2~7 回が一般的であるがさまざまな方法が知られている。次

5 いで脾臓等に由来する抗体産生細胞と骨髓腫瘍細胞（ミエローマ細胞）等の試験管内で増殖能力を有する細胞を融合する。抗体産生細胞はマウス、ヌードマウス、ラットにより得ることができる。

上記融合法としては、既にそれ自体公知であるケーラーとミルスタインの定法 (Nature. 256, 495. 1975) によってポリエチレングリコール (PEG) を用いること

10 で融合できる。またセンダイウィルス、電気融合法によっても融合を行うことができる。

融合した細胞からヒト TRACP 5b を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択する方法としては以下のようにして行うことができる。即ち、上記融合した細胞から限界希釈法によってHAT培地及びHT培地で生存している細胞により作ら

15 れるコロニーからハイブリドーマを選択するのである。96 穴ウェルなどにまかれた融合細胞からできたコロニー培養上清中にヒト TRACP 5b に対する抗体が含まれている場合には、ヒト TRACP 5b をプレート上に固定化したアッセイプレート上に上清をのせ、反応後に抗マウスイムノグロブリン-HRP 標識抗体等、2 次

20 標識抗体を反応させる ELISA 法により、ヒト TRACP 5b に対するモノクローナル抗体産生クローンを選択できる。標識抗体の標識物質には HRP の他、アルカリ性ホスファターゼなどの酵素、蛍光物質、放射性物質等を用いることができる。またコントロールとしてブロッキング剤である BSA のみを結合したアッセイプレートによる ELISA を同時に行うことでヒト TRACP 5b 特異的抗体のスクリー

25 ニングができることになる。つまりヒト TRACP 5b プレートで陽性であり、BSA による ELISA で陰性のクローンを選択するのである。

また、同時に抗マウスイムノグロブリン抗体をマイクロタイタープレートにまき、ここに融合細胞培養上清を加えて反応させ、更に精製 TRACP 5b を加えて活性酵素を結合させて免疫複合体を作製し、この結合酵素活性を pNPP のような発色基質を利用して測定することもできる。

本発明の第一のモノクローナル抗体としては、ヒト TRACP 5b を特異的に認識するモノクローナル抗体のうち、特に活性型ヒト TRACP 5b と反応し、かつ赤血球、血小板、好中球、前立腺由来の酸性ホスファターゼ及びポテト ACP と交差反応しないもので、更に不活性フラグメントとの反応性が低いものが含まれる。

- 5 たとえば本発明者が樹立したハイブリドーマ Trk62 が産生するモノクローナル抗体が挙げられる。また、第二のモノクローナル抗体としては、ヒト TRACP 5b 不活性フラグメントを特異的に認識するモノクローナル抗体のうち、特に活性ヒト TRACP 5b とほとんど反応せず、かつ赤血球、血小板、好中球、前立腺由来の酸性ホスファターゼ及びポテト ACP と交差反応しないものが含まれる。たとえ
- 10 ば本発明者が樹立したハイブリドーマ Trk49 が産生するモノクローナル抗体が挙げられる。

- また特に本発明に使用する第一抗体としては活性酵素を特異的に結合するために不活性ヒト TRACP 5b フラグメントよりも活性ヒト TRACP 5b に親和性が高い抗体が好ましく、特に好ましくは第二抗体の活性ヒト TRACP 5b 結合定数よりも
- 15 高い結合定数を持つものがあげられる。また第二抗体としては第一抗体の活性ヒト TRACP 5b 結合定数よりも高い不活性型フラグメント結合定数を持つものがふさわしい。第一抗体としてはたとえば本発明者が確立したハイブリドーマ Trk62 が産生するモノクローナル抗体が挙げられる。また第二抗体としては本発明者が確立したハイブリドーマ Trk49 が産生するモノクローナル抗体が挙げられる。
- 20 上記ハイブリドーマ Trk49 および Trk62 は、〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD) にそれぞれ、平成 14 年 11 月 27 日に受託番号 IPOD FERMBP-8249 として、また平成 14 年 2 月 14 日に受託番号 IPOD FERM BP-7890 として寄託されている。

- 25 上記ハイブリドーマは通常細胞培養に用いられる培地、例えば α -MEM、RPMI1640、ASF、S-cloneなどで培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を回収することができる。またハイブリドーマが由来する動物、ヌードマウスをあらかじめプリスタン処理しておき、その動物に細胞を腹腔内注射することによって腹水を貯留させ、その腹水からモノクローナル抗体を回収することもできる。

上記の上清、腹水よりモノクローナル抗体を回収する方法としては、通常法を用いることができる。たとえば硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどによる塩析法やクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAなどによるアフィニティクロマトグラフィーなどが挙げられる。

- 5 上記方法によって精製された本発明によるモノクローナル抗体によって血清検体中の TRACP 5b を精密測定することができる。以下に本発明の免疫測定法について説明する。

- 本発明の免疫測定法は、例えば、以下のようにして行える。まず、第一抗体及び第二抗体をプレート等の不溶性固相支持体に吸着させておき、それ以外は、通常
- 10 常の ELISA 法と同様の操作で実施できる。まず、2種抗体が吸着しているその支持体に、測定すべき検体を加える。この場合、結合定数の違いから、検体中の競合物質は、主に、支持体に吸着している第二抗体と抗原抗体反応し、次いで、検体中の目的物質は、主に、支持体に吸着している第一抗体と有利に抗原抗体反応する。次いで、その固相支持体を、場合により洗浄した後、固相に結合した目的物質のレベルを測定することにより、検体中の目的物質を測定することができる。このとき、目的物質が TRACP5b のような活性型酵素の場合、pNPP(パラニトロフェニルリン酸)のような対応する基質溶液をその固相支持体に加えて酵素反応させ、固相に結合した目的物質のレベルを測定することにより、検体中の目的物質を精密に測定できる。
- 15 また、本発明においては、第一抗体を吸着させる担体が不溶性固相支持体であり、第二抗体は、ラテックス等の溶液中で分散できる担体に吸着させるか、溶解させてもよく、その場合は、例えば、以下のようにして目的物質を測定できる。まず、第二抗体をラテックス等の溶液に分散しうる担体に感作させておくか溶解させておき、一方、第一抗体を固相支持体に吸着させておく。次いで、その固相
- 25 支持体に、その第二抗体を含む溶液と測定すべき検体とを加えることにより、検体中の競合物質を主に第二抗体と抗原抗体反応させ、また、目的物質を主に第一抗体と抗原抗体反応させる。次いで、その固相支持体を、場合により洗浄した後、固相に結合した目的物質のレベルを測定することにより、検体中の目的物質を測定することができる。このとき、目的物質が TRACP5b のような活性型酵素の場

合、pNPP(パラニトロフェニルリン酸)のような対応する基質溶液をその固相支持体に加え、固相に結合した目的物質を測定することにより、検体中の目的物質を正確に測定できる。

5 以上に説明した通り、通常、第一抗体を吸着させる担体は、不溶性固相支持体である。第二抗体は、不溶性固相支持体に吸着させておくか、ラテックス等の溶液中に分散させておくか、溶解させておいて使用される。

不溶性固相支持体とは、ELISA 法等の固相免疫測定法に用いるものであれば限定されない。例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ナイロン、ポリメタクリレートなどが挙げられる。これらのそれ自体公知である固相に直接、または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーを利用して本発明によるモノクローナル抗体を結合させる。感作抗体量は 1ng～100mg/ml の範囲であることが多い。物理結合や化学結合、アフィニティーなどによって固相に結合したモノクローナル抗体にヒト TRACP 5b を測定する検体を加えて反応させる。一定時間反応させた後、固相を洗浄し発色基質を加え反応させる。基質には既知の pNPP などを用いることができる。

第二抗体を吸着する溶液中に分散できる担体とは、ラテックス粒子、磁性粒子、脂質粒子等を例示できる。更に化学合成ポリマー、天然ポリマー、例えば、デキストランなどに第二抗体を結合させて溶液中に分散させたおいたものも使用できる。この場合、ELISA法の緩衝液試薬中に競合物質を結合する第二抗体を添加することによって固相プレート上の目的物質の測定を有利にすることができる。不溶化担体に第二抗体を結合させて固相プレートに吸着した第一抗体と競合させ、目的物質測定を有利にすることができる。また化学合成もしくは天然ポリマー、例えばデキストランなどに第二抗体を結合させて緩衝液試薬中に添加することで目的物質の測定を有利にすることができる。

25 本発明の免疫測定法を行うためのキットは、上記した第一抗体と第二抗体との2種類の抗体を含むものであり、これらは、必要に応じて、上記したように、不溶性固相支持体あるいはラテックス等の溶液中で分散できる担体に吸着されていてもよい。また更に必要に応じて、抗体に結合した目的物質を測定するための試薬を含んでいてもよい。

本発明では、上記したハイブリドーマ Trk49 および Trk62 から産生されるモノクローナル抗体 Trk49 および Trk62 を用いて、後の実施例 1 で詳述するように、プロテインチップテクノロジーにより、各種血清中の TRACP 5b フラグメントを実際に調べた結果、骨吸収が活発な小児血清あるいは骨粗鬆症患者血清中に、

5 分子量約 5580 Da、5795 Da、6860 Da または 7075 Da の TRACP 5b のフラグメントが見出されることが明らかになった。従って、これらの TRACP 5b のフラグメントが、骨疾患、例えば骨吸収が活発な骨疾患の診断用マーカー分子となり得ることが判明した。従って、患者からの血清、血漿、血液などの検体中にこれらのマーカー分子が存在するか否かを検出することにより、あるいはこれらのマーカー

10 一分子の量を測定することにより、骨疾患を診断することができる。

マーカー分子の存否の検出あるいはその量の測定は、現在既知のあらゆる方法を採用することができる。例えば、質量分析法、免疫測定法、電気泳動法、液体クロマトグラフィー法、ガスクロマトグラフィー法などが挙げられる。質量分析法としては、レーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (LDI-TOF-MS) により行

15 う方法が挙げられる。レーザーイオン化飛行時間型質量分析計としては、表面増強レーザー脱離イオン化 (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) 飛行時間型質量分析計 (SELDI-TOF MS法)、マトリックス支援レーザーイオン化 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS法) などを例示できる。例えば、SELDI-TOF MS法を用いる場合、

20 CIPHERGEN 社により開発されたプロテイン・バイオロジー・システム II・マス・スペクトロメーター (Ciphergen Biosystems, Inc) を使用することができる。この機械は SELDI (surface enhanced laser desorption ionization) と飛行型質量分析計を組み合わせたプロテインチップテクノロジーである。その詳細は WO 01/25791 A2号公報、特開2001-281222号公報等に詳しい。SELDI-TOF MS法の場合、

25 通常、検体を、前処理した後、チップに吸着させて、SELDI-TOF MS質量計に付す。検体が血清の場合、アルブミンの吸着剤を用いるか、イオン交換チップでアルブミンが電荷をもたなくなるまでバッファーで洗浄してアルブミンを系から除去することが好ましい。これらの方法に用いられるプロテインチップとしては、上記したマーカー分子を吸着できるチップであれば特に限定しない。例えば、疎水性

やイオン交換などの蛋白質に親和性を持つ官能基が修飾されているチップ（ケミカルチップともいう）、目的の蛋白質に対する抗体を固定化したチップ（バイオケミカルチップ）等を例示できる。

その他の質量分析法としては、例えば ESI 法（Electrospray Ionization）による質量分析法が挙げられる。ESI 法の場合は、プロテアーゼ処理等の前処理した検体を、高速液体クロマトグラフィー等の分離手段と直結した質量分析計に付するのが好ましいことが多い。免疫測定法としては、マーカー分子に対するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を作成し、従来知られている蛋白質を測定する方法を挙げることができる。そのような免疫測定法として、酵素免疫測定法（EIA法）、免疫比濁測定法（TIA法）、ラテックス免疫凝集法（LATEX法）、電気化学発光法、蛍光法などを例示することができる。またイムノクロマト法、試験紙を利用した方法も有効である。これらの方法は、いずれも当業者に周知の方法でありこれら周知の方法をそのまま採用することができる。

これらの方法以外にも、電気泳動法、液体クロマトグラフィー（LC）法、ガスクロマトグラフィー（GC）法などが挙げられる。これらの方法も既に当業者に周知であり、それらの周知の方法をそのまま採用することにより、測定することができる。

以下に好ましい実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例等により何ら限定されるものではない。

実施例 1

（1）モノクローナル抗体作製用抗原の選択と準備

抗ヒト TRACP モノクローナル抗体作成のための抗原として、ヒト破骨細胞由来の TRACP 5b を準備した。以下に精製法を述べる。

インフォームド・コンセントを行った後、外科的手術により摘出されることになったヒト大腿骨骨頭部 130g を液体窒素中で凍結させ、ハンマーで粉碎後、プロテアーゼインヒビターを含む緩衝液（50mM Tris-HCl, 0.3M KCl, 1mM PMSF, 1mM EDTA・2Na, 0.1% Triton X-100, 0.02% NaN₃, 1 unit/ml アプロチニン pH7.5）200mL 中に懸濁させ、超音波ホモジナイザーにてホモジナイズした。4℃

- 一晩攪拌後、10,000rpm, 20 分遠心分離し、その上清を 10mM トリス緩衝液 pH8.2 に透析後 CM-Sepharose カラム (φ 40mm×40cm) (SIGMA) にアプライし、吸着したタンパク質を NaCl を含む上記トリス緩衝液の直線濃度勾配 (0-0.5M NaCl) で溶出した。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性は、基質パラニトロフェニルリン酸を用い測定し、活性の高い部分をプールした。それを濃縮後、0.7M NaCl を含む 20mM トリス緩衝液 pH7.2 に透析し、Superdex 200 カラム (φ 16mm × 60cm) (Amersham Pharmacia Biotech) にアプライし、同様に溶出したフラクションの酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性を測定し、活性部分をプールした。それを 20mM トリス緩衝液 pH7.2 で 2 倍に希釈し、HiTrap Heparin HP カラム (5mL) (Amersham Pharmacia Biotech) にアプライし、吸着したタンパク質を NaCl を含む上記 20mM トリス緩衝液 pH7.4 の直線濃度勾配 (0.35M-1M NaCl) 塩濃度勾配をかけ溶出した。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ高活性フラクションをプールし、濃縮することにより、精製破骨細胞由来酸性ホスファターゼを 0.4mg 得た。
- 15 なお、タンパク量は A_{280} により確認し、純度は SDS-PAGE (TIFCO) を行い銀染色の結果、分子量 35,000 付近でシングルバンドであることにより確認した。単一バンドになった酵素は精製 TRACP 5b として免疫抗原とした。

(2) 免疫

- 精製ヒト破骨細胞由来酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRACP 5b) を 250 $\mu\text{g/ml}$ となるように 50mM クエン酸緩衝液 (pH5.5) で希釈し、25 μg (100 μl) をとってフロインド完全アジュバンド (WAKO) 100 μl と乳化するまでよく混和した。調製した懸濁液を Balb/c 6 週齢 雌マウス (日本クレアー) にジエチルエーテル麻酔下にて腹腔内投与した。2週間後には同量の TRACP 5b (25 $\mu\text{g/ml}$) をフロインド不完全アジュバンド (WAKO) と混和してフロインド完全アジュバンドの時と全く同様の操作により乳化懸濁液とし、それぞれマウスに感作した。以降 2 週間後に同様の操作を行い、4 回目には最終免疫として TRACP 5b 25 $\mu\text{g/ml}$ を 50mM クエン酸緩衝液 (pH5.5) で調製しマウス尾静脈注射により投与した。

(3) ハイブリドーマの確立

最終免疫より3日後に TRACP 5b により感作済みのマウスよりジエチルエーテル麻酔下に外科的摘出された脾臓を無菌的に分散し脾臓細胞を調製した。融合はケーラーとミルスタインの方法 (Nature. 256, 495. 1975) に従って行われ、ポリエチレングリコール (PEG4000) (MERK) を用いて脾細胞と骨髓腫細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) を融合した。その融合比率は脾臓細胞数 8×10^7 個に対して骨髓腫細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) 2×10^7 個で、4:1であった。融合細胞は 10% FCS (INVITROGEN) α -MEM (IRVINE) HAT (コスモバイオ) 培地に分散し 96 穴マイクロタイターカルチャープレート (住友ベークライト) に分注して 37°C、5% CO₂ 条件にて培養した。

10 (4) スクリーニング

約 2 週間後にコロニーの生育を確認してスクリーニングを実施した。スクリーニングの実施法を以下に述べる。

スクリーニング用プレートを作製するために上記 (1) にて精製した TRACP 5b を 50mM クエン酸緩衝液中に溶解し、 $0.5 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}/\text{well}$ となるように 96 穴ウェル (Nunc) に分注した。プレートを 4°C で 2 晩静置した後に 0.05% Tween 20 を含むトリス緩衝液で 3 回洗浄し、非特異的反応を抑えるために 1.5% BSA 溶液を $200 \mu\text{l}$ 分注して、更に 4°C で 1 晩静置した。完成したプレートを 0.05% Tween 20 を含むトリス緩衝液で 3 回洗浄した後に培養上清 $100 \mu\text{l}$ を反応させ、更に洗浄を行った後に 2 次抗体である HRP 標識抗マウスイムノグロブリン抗体 (Zymed) を加えて反応させた。洗浄後に HRP の発色基質である 3mg/ml o-フェニレンジアミン (OPD) (Nakalai) クエン酸発色溶液を $100 \mu\text{l}$ 加えて一定時間の発色後、1N 硫酸を停止液として更に $100 \mu\text{l}$ 添加し、測定波長 492nm にて吸光度を測定した。上記のようにして陽性になったクローンは限界希釈法によって再クローニングされ上清を再度チェックした。

25 (5) 抗体の確認

ELISA によって精製 TRACP 5b との反応性を確認すると、クローン Trk49、Trk62 ではアフィニティーに差があったが、プレートと感度よく反応した。その結果、クローン Trk49、Trk62 を TRACP 5b を認識したものとして選択したのである。得られた抗体をモノクローナル抗体タイピングキット (Amersham

Pharmacia Biotech) にて検定した結果、以下の表 1 のような結果であった。

表 1 : クローンの特性

| | | クラス | 軽鎖 |
|---|------------|------|----------|
| 5 | クローン Trk49 | IgG1 | κ |
| | クローン Trk62 | IgG1 | κ |

(6) モノクローナル抗体の作製及び精製

上記 (5) で得られたハイブリドーマ Trk49、Trk62 1×10^7 細胞個をプリスタン (アルドリッチ) 0.5ml 投与後 2 週間の Balb/c マウス (日本クレアー)、
 10 週齢、雌性に腹腔内投与し、約 2 週間後にマウス腹腔内に貯留した腹水をジエチルエーテル麻酔下にて外科的に採取した。上記 (4) のスクリーニングで行った ELISA 法により、腹水をサンプルとして段階希釈して確認すると高濃度のモノクローナル抗体が含まれていた。この腹水を硫酸 40% で処理し、PBS に透
 15 析した後、プロテイン G カラム (Amersham Pharmacia Biotech) により精製して SDS-PAGE により確認した。すると Trk49、Trk62 とともに非還元では分子量約 150,000 に単一の、メルカプトエタノール還元では分子量約 50,000 のバンドと 25,000 の 2 本のバンドが確認された。精製された抗体は Trk49、Trk62 とともにマウス 1 匹あたり約 15mg またはそれ以上であって工業的利用を行うには十分量
 20 であった。

(7) 特異性検定

モノクローナル抗体 Trk49、Trk62 の特異性を調べるためにさまざまなアイソフォーム (TRACP 5b、赤血球、血小板、PAP (SIGMA)、ポテト ACP (SIGMA 社)) を用いて下記の実験を行った。測定方法は簡単には以下のとおりである。

25 固相プレート (Nunc) 上に Protein G を利用して精製したモノクローナル抗体を $2 \mu\text{g}/\text{well}$ になるように分注し、 4°C で 2 日間静置した。0.05% Tween 20 を含む 20 mM Tris (pH7.0) 洗浄液にて 3 回洗浄した後、1.5% BSA Tris (pH7.0) を $200 \mu\text{L}$ 加えて 4°C で一晩ブロッキングした。このようにして作製したプレートを先の洗浄液で 1 回洗浄して、各種アイソフォームの酵素活性を

全て 10IU/Lにあわせ、その 100 μ l を抗体結合プレート上に加えた。室温で 2 時間反応させ、反応終了後、前出の洗浄液にて3回洗浄して 100 μ l の酸性ホスファターゼ基質を加えて、37°C、1時間反応させて抗体が捕らえた酵素が基質を発色させることから検体中酵素量の定量を行った。測定は反応停止液 50 μ l を
5 加えた後に測光波長 405nm で行った。

結果として Trk49、Trk62 は TrACP 5b としか反応せず、他アイソフォームとの交差性を示さないことから非常に特異性の高いモノクローナル抗体であることがわかった。

(8) SELDI 法を利用したフラグメント確認

10 近年、surface enhanced laser desorption ionization (SELDI)と飛行型質量分析計を組み合わせたプロテインチップテクノロジーが米国 CIPHERGEN 社により開発され、新規腫瘍マーカーの検出などへ臨床応用が始まっている。本発明者らは本テクノロジーを応用し、樹立したハイブリドーマ Trk49、Trk62 が産生するモノクローナル抗体を利用して血清中 TRACP 5b フラグメントを実際にとらえ
15 ることを試みた。

1) PS20 チップによる実験

はじめに本発明者らは PS20 プロテインチップアレイ (CIPHERGEN Biosystems, Inc) を用いて抗体 Trk49、Trk62 と反応する血清中の TRACP 5b、またはそのフラグメントを検索した。PS20 チップは抗体結合チップのことであり、初めに金属上に結合させた抗体と検体中の反応物質を抗体に結合させ、レーザーによって抗体から解離した抗体反応物が真空中を飛行することから、その量と分子量を決定するという特徴を持っている。以下にプロテインチップアレイ実験操作法を簡単に述べる。はじめに合成培地 S-clone (三光純薬) に馴化させたハイブリドーマ Trk49、Trk62 を培養し、Protein Gカラム (Amersham
20 Pharmacia) によってそれぞれの抗体を精製した。この抗体濃度を 500 μ g/mL にあわせてその 2 μ Lを PS20 チップにアプライし、室温にて 1 時間反応させた後 5 μ L のブロッキングバッファー (1M エタノールアミン PBS pH8.0) (WAKO) を加え室温 10 分間反応させた。ブロッキング後 8mL の洗浄バッファー (0.5% Triton 100 PBS) にて室温、5 分間洗浄した。これを 2 回繰り返し PBS で軽く

すすいだ。反応スポットの周りを軽く拭いて 3 μ L の健常人ボランティア血清、
12 歳以下の小児血清、骨粗鬆症患者ホルモン補充治療前、骨粗鬆症患者ホルモ
ン補充治療後の 4 検体を別々にアプライし、4°C で一晩反応させた。反応終了後、
キムワイプ（十條キンバリー）にてサンプルを吸収し、8 mL の洗浄バッファー
5 (0.5% Triton 100 PBS) にて室温、5 分間洗浄した。これを 2 回繰り返して
PBS で軽くすすぎ、キムワイプ（十條キンバリー）にて水滴を拭き取り 0.5 μ L
の飽和シナピン酸 (CIPHERGEN Biosystems, Inc) /50%アセトニトリル (Wako)
/0.5%TFA (Wako) 溶液を 2 回添加した。作製したプロテインチップアレイは、
プロテイン・バイオロジー・システム II・マス・スペクトロメーター
10 (CIPHERGEN Biosystems, Inc) によって読み取った。

2) PS20 チップによる実験結果

図 1、図 2 に測定データを示す。このデータフォーマットでは、PS20 プロテ
インチップから脱着されたサンプルのタンパク質の分子量を横軸に、その分子量
で検出器に到達した分析物の量を反映するピークを縦軸で表すことができる。こ
15 の時の縦軸の単位は Arbitrary Units (AU) とする。本実験では小児血清及び骨
粗鬆症患者ホルモン補充治療前血清が骨吸収の活発な血清である。結果として
Trk49 抗体の実験区にのみ骨吸収の活発な上記 2 つの実験区で 5795Da 付近、
6860Da 付近のピークが認められた（図 1 の(2)、図 2 の(5)）。このピークは骨
吸収の緩やかな成人血清では認められない（図 1 の(1)、(3)）。ピークの大きか
20 った小児血清では更に 5580、7075（図 1 の(2)）Da 付近のピークも確認できる。
骨粗鬆症患者の 5795Da 付近、6860Da 付近のピークはホルモン補充療法で治療
後に消えている（図 2 の(6)）。なお、ピークの分子量標記で付近としているの
は、この実験では、通常、20 以内の測定誤差があるときがあるからである。ま
た、Trk62 抗体を用いた実験区では骨吸収の活発な血清からは、特異的なフラグ
25 メントを認めなかった（図 1 の(3)、(4)）。結果として発明者はこれまで知られ
ていなかった全く新規の TRACP 5b フラグメント数種類を発見することに成功し
た。実際にはサイファジェン社 SELDI-TOF MAS によって約 5795Da 付近、
5580Da 付近、6860 Da 付近、7075Da 付近に検出される蛋白質またはその分解物
である。これらのフラグメントは全く新規の物質であり、骨吸収や病態を反映す

るマーカーである。このフラグメント結合量は各抗体の結合定数とよく相関していた。特に注目すべきは Trk62 の反応性である。Trk62 は Trk49 によって結合するフラグメントとは殆ど反応せず、活性酵素に対する特異性が高いことが証明された。逆に Trk49 はフラグメントと非常によく反応していた。これらの事実より本発明の 2 種類のモノクローナル抗体、Trk49 及び Trk62 は、それぞれ、フラグメント、酵素、に対して特異性が高く、そのため、本発明において、それら 2 つの抗体を用いた酵素免疫測定法により、TRACP 5b を特異的、高感度に測定できると考えられる。

(9) モノクローナル抗体結合定数の測定

- 10 抗原に対する結合定数を求めるため下記の実験を行った。方法は(蛋白質・酵素基礎実験法、南江堂)に従って行った。2 種類の抗原溶液 (A) 精製 TRACP 5b 及び (B) Trk49 アフィニティカラム精製 TRACP 5b フラグメント (少なくとも分子量約 5580 Da、5795 Da、6860 Da および 7075 Da の TRACP 5b のフラグメントを含む TRACP 5b のフラグメントの混合物) を $5\mu\text{g/mL}$ 20mM クエン酸緩衝液となるように調製し、 $50\mu\text{L}$ ずつ 96 穴プレート (Nunc) に感作させた。4℃、一晩静置した後、0.05%Tween 20 を含む 20mM トリス緩衝液 $200\mu\text{L}$ でプレートを 3 回洗浄し、ブロッキング剤 (1.5%BSA 10% サッカロースを含む 20mM トリス緩衝液) を $100\mu\text{L}$ ずつ加えて 4℃ 一晩静置した。再び 0.05% Tween 20 を含む 20mM トリス緩衝液 $200\mu\text{L}$ でプレートを 3 回洗浄し、12 段階に希釈した抗体溶液 (0、0.1、0.15、0.20、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.75、 $1.0\mu\text{g/mL}$) を $20\mu\text{L}$ ずつ加えて条件 (i) 37℃、(ii) 4℃でそれぞれ 2 時間反応させた。1 次反応後 0.05%Tween 20 を含む 20mM トリス緩衝液 $200\mu\text{L}$ でプレートを 3 回洗浄し、1/1000 希釈標識 2 次抗体 (抗マウス IgG-HRP 標識抗体: Zymed) $50\mu\text{L}$ を加えて 37℃で 2 時間反応させ、0.05%Tween 20 を含む 20mM トリス緩衝液 $200\mu\text{L}$ でプレートを 3 回洗浄した後に 3mg/mL OPD 溶液 $100\mu\text{L}$ を加えて発色させ、0.1N 硫酸溶液 $100\mu\text{L}$ で停止後 492nm にて比色した。

この結果から初めに条件 (i) で 1M あたりの A_{492} における抗体結合量を求める。例えば TRACP 5b プレートの抗体 $0.05\mu\text{g}$ では $A_{492}=0.250$ であった

ので、抗体の分子量を 14.6 万とすると次のように求められる。

$$0.25 / \{0.05 / (0.146 \times 10^{-9})\} = 0.731 \times 10^{-9} \quad (1)$$

- 5 次に (1) で求めた値から条件(ii)の各抗体濃度における結合抗体濃度[PL]を求める。

$$[PL] = \text{条件(ii)における } A_{492} / 1\text{M濃度あたりの } A_{492} \quad (2)$$

- 10 そして加えた抗体濃度から遊離抗体濃度 [PF]を求める。

$$[PF] = \text{加えた抗体濃度} - [PL] \quad (3)$$

- 結合抗体濃度に対して $[PL]/[PF]$ をプロットしてその勾配 ($-nK$) より結合
15 定数 (K_a) を求める。

$$K_a = -\text{勾配} / n \quad (4)$$

- 上記方法より結果として 2 種類のモノクローナル抗体 Trk49、Trk62 の結合
20 定数 (K_a) は下記の表 2 のとおりであった。

表 2 : モノクローナル抗体の結合定数

| モノクローナル抗体 | | 結合定数 |
|-----------|-------------------|--------------------------|
| 25 | Trk49 (TRACP 5b) | $K_a = 0.94 \times 10^9$ |
| | (TRACP 5b フラグメント) | $K_a = 5.25 \times 10^9$ |
| | Trk62 (TRACP 5b) | $K_a = 3.73 \times 10^9$ |
| | (TRACP 5b フラグメント) | $K_a = 0.69 \times 10^9$ |

これを反応系中で考えると反応の強さ、即ち親和性は以下のようになることが

わかった。

Trk49とフラグメントとの反応性>Trk62と酵素との反応性

>Trk49と酵素との反応性>Trk62とフラグメントとの反応性

5

よってモノクローナル抗体 Trk49 は TRACP 5b 自体よりも TRACP 5b フラグメントと反応性が高く、その上 Trk62 の TRACP 5b との結合定数よりも反応性が高いため、はじめに反応系中で選択的に Trk49 と TRACP 5b フラグメントが結合し、競合フラグメントの減少した反応系中で Trk62 はより有利に TRACP 5b
10 と反応することができるとわかった。この結果はプロテインチップ実験結果を裏付けるものである。

(10) ELISA による測定実験

そこで Trk49 1 μ g/well/100 μ L、Trk49 2 μ g/well/100 μ L、Trk62 1
 μ g/well/100 μ L、Trk62 2 μ g/well/100 μ L、(Trk49 1 μ g+Trk62 1 μ g)/
15 well/100 μ Lの5種類のプレートを作製した。プレート作成法は上記(7)のモノクローナル抗体の特異性検定で作製したのと同様である。ただし感作抗体液を100 μ Lに、ブロッキング溶液量を200 μ Lに、サンプル量を100 μ Lに変更して行った。また、1次反応は、プレートに吸着した抗体に、サンプルとして
20 TRACP5b 高値プール血清(少なくとも分子量約 5580 Da、5795 Da、6860 Da および 7075 Da の TRACP 5b のフラグメントを含む)を加え、室温にて、振とう条件下で1時間抗原抗体反応を行った。次いで、洗浄操作を行い、合成基質溶液100 μ Lを添加し、37°Cで1時間、酵素反応をさせた。0.2NのNaOH溶液を加えて反応を停止させ比色定量し、酵素活性を求めた。結果を図3に示す。

結合定数から酵素に反応性が弱く、フラグメントと強い反応性を示す Trk49
25 は酵素との結合活性が弱く測定に必要な感度が得られなかった。一方結合定数より酵素に強い反応性を持つと考えられた Trk62 は良好な直線性を示した。更に Trk49 と Trk62 を混合したプレートではより直線性が長くなり感度も向上していた。抗体量を1 μ gから2 μ gに増量しても直線性、感度には殆ど向上しなかったことから反応に関与する抗体量は1 μ g/wellでほぼ十分であったと考えら

れた。つまり結合定数実験の理論どおり Trk49 は反応系中でフラグメントをほぼ優先的に結合させ、次に Trk62 が Intact な酵素を結合させるため直線性、感度が改善されたと考えられるのである。

(11) ラテックス試薬を利用したフラグメント吸収法

- 5 フラグメントをほぼ特異的に吸収することがわかったモノクローナル抗体 Trk49、またコントロールに Trk62 を使用して、2 種類のモノクローナル抗体をラテックスに感作し、ラテックス試薬を作製した。ラテックス試薬作製は下記のように行った。

- 10 1% ラテックス懸濁液 2mL と、0.1mg/mL Trk49 及び Trk62 抗体溶液 2mL とを混合し、約 1 時間攪拌した。遠心後、沈殿を 1%BSA 溶液に懸濁し、再度約 1 時間攪拌した。再び遠心後、沈殿を PBS 溶液中に懸濁し、ラテックス試薬を得た。このラテックス試薬を 0.15% 及び 0.1% から 1/2 倍ずつ希釈して合計 8 段階のラテックス試薬 (0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.00313、0.00156%) を作成した。以下 ELISA 法における手技について説明する。

- 15 はじめにこのラテックス試薬を Trk62 (2 μ g/well) でまいたプレートに 50 μ L ずつ分注した。次にインフォームド・コンセントを行った TRACP 5b 高値プール血清 (8U/mL) を 100 μ L ずつ加えて、室温、振とうを行いながら 1 時間反応させた。反応後 0.05% Tween 20 を含む 20mM Tris 緩衝液 (pH7.0) で 3 回洗浄し合成基質溶液を加えた。37°C、1 時間インキュベートを行った後、反応
- 20 停止液 (0.2N NaOH 溶液) を 50 μ L 添加して、405/490nm で測定した。結果を図 4 に示す。Trk62 感作ラテックス試薬添加実験ではプレート上のモノクローナル抗体と競合してしまい、添加ラテックス試薬濃度依存的に酵素発色が低下していた。しかし、Trk49 では 0.1~0.15% ラテックス試薬添加実験で有意に酵素発色値が上昇するなど、競合フラグメント吸収にプレートへの抗体同時感作に限らず
- 25 このようなラテックスなどの抗体吸着用担体を用いる吸収法も有効であることが示された。また、Trk49 をラテックスに感作せず、溶液に溶解させたものを用いても有効であった。

以上に詳細に説明した通り、本発明の免疫測定法では、測定対象目的物質と反応性の高い第一抗体と、目的物質の不活性フラグメントなど競合する物質と強く反応する第二抗体を組み合わせて使用することで反応系中の競合物質の影響を除き、活性酵素等の目的物質を特異的に精密測定することができる。

請 求 の 範 囲

1. 検体中の目的物質を2種類の抗体を用いて測定する免疫測定法であって、
(i) 第一抗体が目的物質と競合物質に親和性があり、(ii) 第一抗体が競合
5 物質より目的物質に親和性があり、(iii) 第二抗体が目的物質より競合物質に
親和性があり、かつ(iv) 第二抗体の競合物質への親和性が、第一抗体の目的物
質への親和性より大きい、第一抗体および第二抗体の2種類の抗体を用い、
担体に吸着している第一抗体と、第二抗体とに、検体中の目的物質および競合
物質を結合させ、
10 次いで、結合した目的物質のレベルを測定することにより、該検体中の目的物
質を測定する免疫測定法。
2. さらに、第二抗体の目的物質への親和性が、第一抗体の競合物質への親和
性より大きい請求項1記載の免疫測定法。
3. 目的物質が活性型酵素であり、かつ結合した目的物質のレベルを測定する
15 ことが該活性型酵素の酵素活性を測定する請求項1または2記載の免疫測定法。
4. 競合物質が該酵素活性のない物質である請求項3記載の免疫測定法。
5. 競合物質が酵素分解産物である請求項3または4記載の免疫測定法。
6. 活性型酵素が酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ 5b (TRACP 5b) である請
求項3から5のいずれかに記載の免疫測定法。
- 20 7. 担体が不溶性固相支持体である請求項1から6のいずれかに記載の免疫測
定法。
8. 第一抗体を吸着させる担体が固相支持体であり、かつ第二抗体が溶液中に
分散している担体に吸着しているか、または溶解している請求項1から7のい
ずれかに記載の免疫測定法。
- 25 9. 検体中の目的物質を2種類の抗体を用いて免疫測定するためのキットであ
って、
(i) 第一抗体が目的物質と競合物質に親和性があり、(ii) 第一抗体が競合
物質より目的物質に親和性があり、(iii) 第二抗体が目的物質より競合物質に
親和性があり、かつ(iv) 第二抗体の競合物質への親和性が第一抗体の目的物質

への親和性より大きい、第一抗体および第二抗体の2種類の抗体を含むキット。

10. 第一抗体と第二抗体が担体に吸着されている請求項9記載のキット。

11. 第一抗体が固相支持体に吸着されており、かつ第二抗体が溶液中に分散可能な担体に吸着されているか、または溶解している請求項9または10に記載

5 のキット。

12. 分子量約 5580 Da、5795 Da、6860 Da または 7075 Da の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ 5b (TRACP 5b) のフラグメントからなる骨疾患診断用マーカー分子。

1/3

FIG. 1

プロテインチップ測定結果

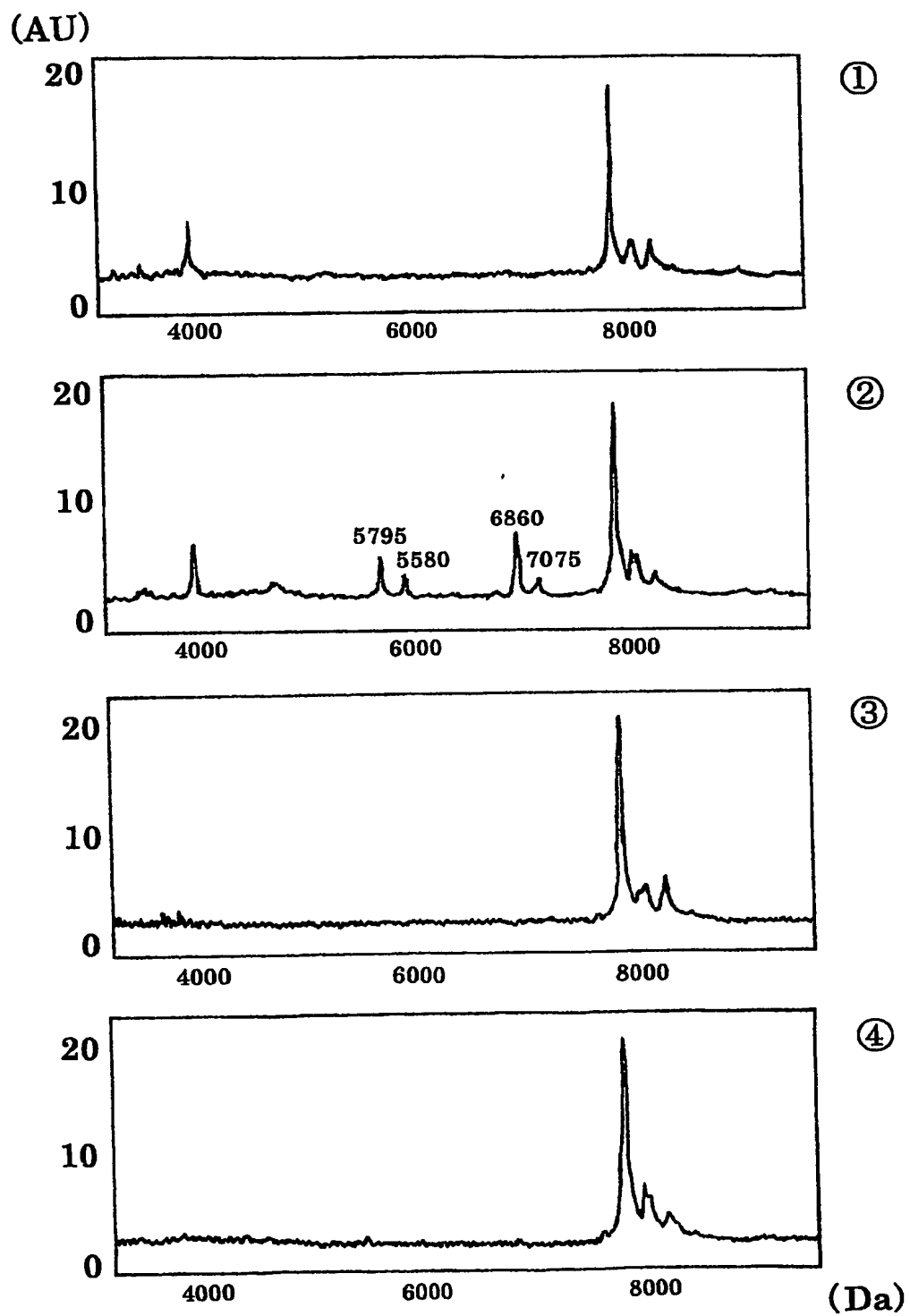
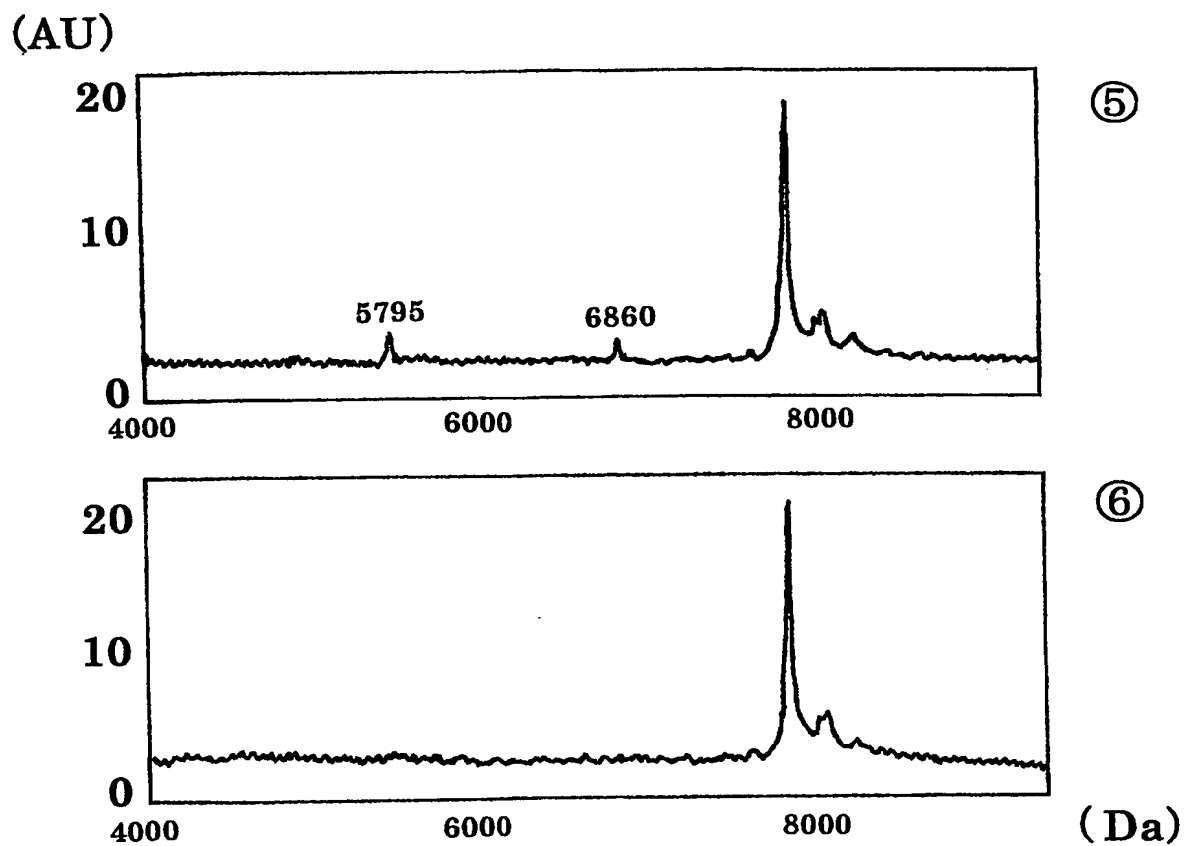


FIG. 2

プロテインチップ測定結果



- | | |
|--------------------|-------------------|
| ① Trk49 抗体プロテインチップ | 成人血清 |
| ② Trk49 抗体プロテインチップ | 小児血清 |
| ③ Trk62 抗体プロテインチップ | 成人血清 |
| ④ Trk62 抗体プロテインチップ | 小児血清 |
| ⑤ Trk49 抗体プロテインチップ | 骨粗鬆症患者ホルモン補充療法前血清 |
| ⑥ Trk49 抗体プロテインチップ | 骨粗鬆症患者ホルモン補充療法後血清 |

3/3

FIG. 3

ELISA法による測定結果

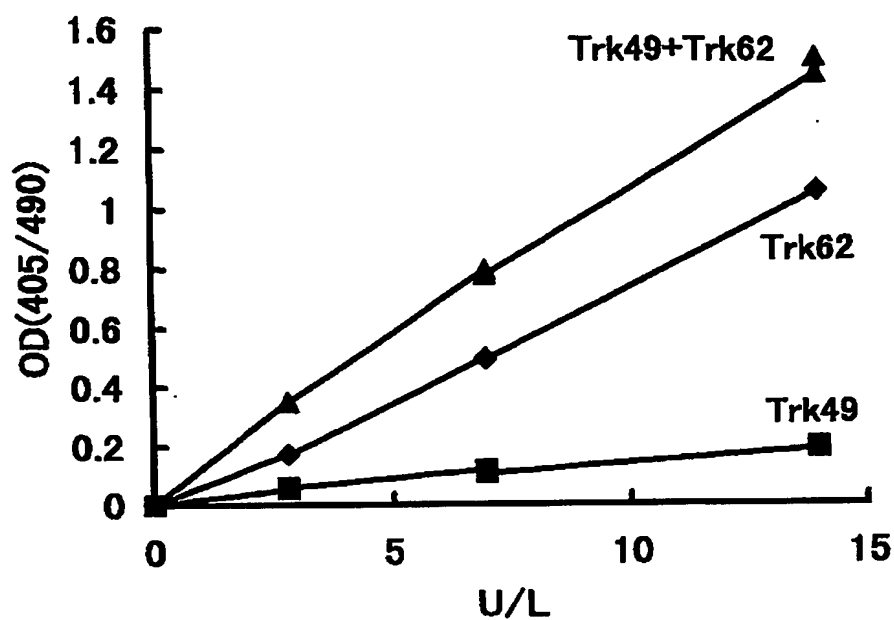
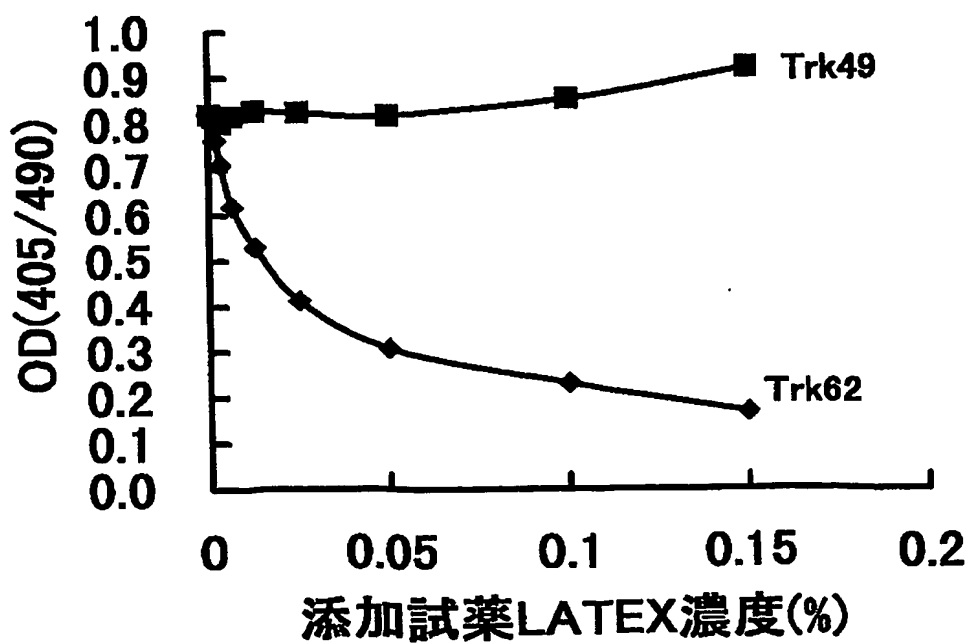


FIG. 4

LATEX試薬添加ELISA実験結果



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16601

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53-33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2004 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2004 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2004 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA, BIOSYS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | JP 60-501674 A (Ekins Roger Philip), 03 October, 1985 (03.10.85), Claims & WO 85/00226 A & EP 149631 A & GB 8317124 A & DE 3475351 A & US 4745072 A | 1-11 |
| A | JP 63-030766 A (Boehringer Mannheim GmbH.), 09 February, 1988 (09.02.88), & DE 3624464 A & EP 254929 A & KR 9616717 B & US 5037764 A | 1-12 |
| A | JP 10-221341 A (Mitsui Chemicals, Inc.), 21 August, 1998 (21.08.98), (Family: none) | 1-12 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
17 March, 2004 (17.03.04)

Date of mailing of the international search report
30 March, 2004 (30.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16601

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | JP 2002-031640 A (Yamasa Corp.), 31 January, 2002 (31.01.02), (Family: none) | 1-12 |
| A | JP 6-289020 A (Teijin Ltd.), 18 October, 1994 (18.10.94), (Family: none) | 1-12 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16601

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 11 pertain to inventions relating to immunoassays with the use of a first antibody and a second antibody, while claim 12 pertains to a marker for diagnosing bone diseases per se comprising a tartaric acid-resistant acid phosphatase fragment which has no relationship thereto.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53-33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2004年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2004年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2004年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA BIOSYS

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | JP 60-501674 A(イーキンズ, ロジャー フィリップ) 1985.10.03 特許請求の範囲参照 & WO 85/00226 A & EP 149631 A & GB 8317124 A & DE 3475351 A & US 4745072 A | 1-14 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.03.2004

国際調査報告の発送日

30.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | JP 63-030766 A(ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミ ット・ベシユレンクル・ハフツング) 1988. 02. 09 & DE 3624464 A & EP 254929 A & KR 9616717 B & US 5037764 A | 1-12 |
| A | JP 10-221341 A(三井化学株式会社) 1998. 08. 21 (ファミリーなし) | 1-12 |
| A | JP 2002-031640 A(ヤマサ醤油株式会社) 2002. 01. 31 (ファミリーなし) | 1-12 |
| A | JP 6-289020 A(帝人株式会社) 1994. 10. 18 (ファミリーなし) | 1-12 |

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-11 は、第1抗体、第2抗体を用いた免疫測定に関する発明であるのに対し、請求の範囲 12 は、それとは何ら関連のない、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼフラグメントからなる骨疾患診断用マーカー自体である。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。